

31.08.2004

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

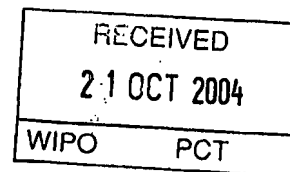
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2004年 3月 8日  
Date of Application:

出願番号 特願2004-063370  
Application Number:

[ST. 10/C]: [JP 2004-063370]

出願人 小野 信文  
Applicant(s):

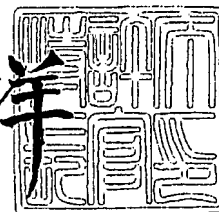


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年10月 8日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川 洋



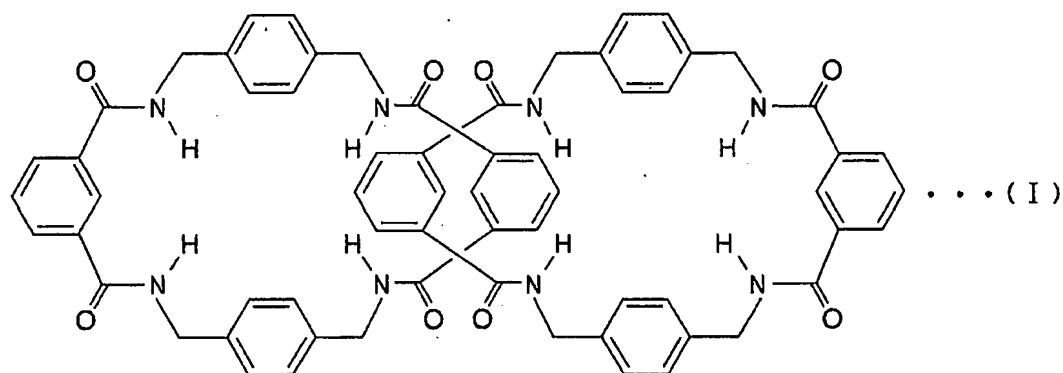
【書類名】 特許願  
【整理番号】 X0104001  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C07K 5/12  
【発明者】  
    【住所又は居所】 福岡県福岡市城南区樋井川二丁目14番7号  
    【氏名】 小野 信文  
【特許出願人】  
    【住所又は居所】 福岡県福岡市城南区樋井川二丁目14番7号  
    【氏名又は名称】 小野 信文  
【代理人】  
    【識別番号】 100115738  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 鷺頭 光宏  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 215327  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

化学式 (I)

【化 1】



で表されるカテナン化合物を有効成分として含有する抗ガン剤。

【請求項 2】

前記カテナン化合物は溶液中に溶解しており、前記カテナン化合物の前記溶液中における濃度が  $300 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上であることを特徴とする請求項 1 に記載の抗ガン剤。

## 【書類名】明細書

## 【発明の名称】抗ガン剤

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は抗ガン剤に関し、特に、カテナン化合物を有効成分として含有する抗ガン剤に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

わが国の平均寿命は30年前と比べて10歳以上も延びているが、これは死亡原因として従来多かった脳卒中や心疾患の治療薬が数多く開発されたことが大きな原因の一つと考えられている。しかしながら、死亡原因として脳卒中や心疾患が少なくなるにつれ、ガン（悪性新生物）による死亡が年々増加している。現在では、死亡原因の第一位はガンであり、このため現在数多くの研究者によって抗ガン剤の開発が行われている。

## 【0003】

多くの抗ガン剤は、ガン細胞に吸収されて初めて作用することから、これまでは受容体を介した取り込みが容易となるよう、分子量が小さく且つ構造の安定した薬剤が有効であると考えられてきた。

## 【特許文献1】特開平11-80136号公報

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0004】

しかしながら、受容体を介した吸収の容易な抗ガン剤は、逆に細胞から排出されやすいことが多く、このためガン細胞内にとどまりにくいという問題があった。しかも、一度抗ガン剤を排出したガン細胞は、当該抗ガン剤に対して耐性を持つことがあり、同じ抗ガン剤が効かなくなるという問題もあった。

## 【0005】

また、受容体を介した吸収の容易な抗ガン剤は、正常細胞にも取り込まれやすいため、局所的治療が困難であり、副作用が生じやすいという問題もあった。

## 【0006】

したがって、本発明の目的は、ガン細胞から排出されにくい新たな抗ガン剤を提供することである。

## 【0007】

また、本発明の他の目的は、ガン細胞に対する局所的治療に好適な新たな抗ガン剤を提供することである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0008】

本発明者は、ガン細胞から排出されにくい化合物として、カテナンやロタキサンのように、一部が共有結合によって結合していない高分子新奇化合物（特許文献1参照）に着目した。このような高分子新奇化合物は、分子量が比較的大きく且つ分子が変形しやすいため、一旦ガン細胞に取り込まれば容易に排出されないものと考えられる。しかも、このような高分子新奇化合物は、本来細胞内に吸収されにくいことから、これをガン細胞に対して局所的に使用できれば、正常細胞に与える影響を極めて小さくすることが可能となる。

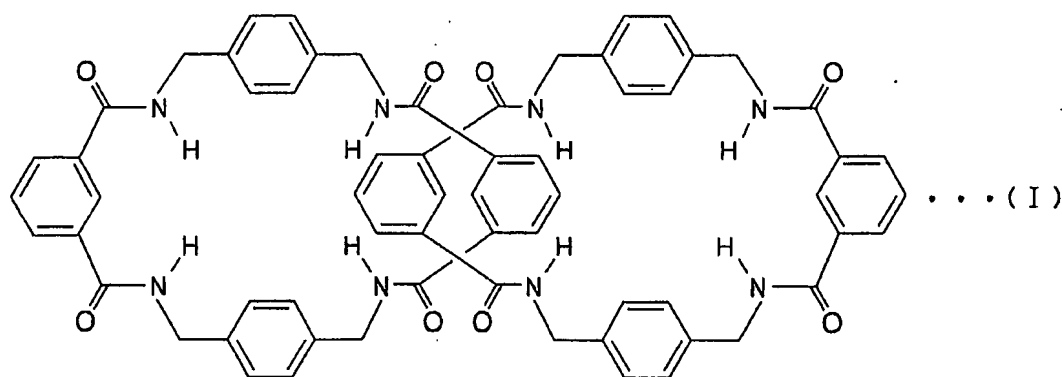
## 【0009】

このような観点から鋭意研究を続けた結果、本発明者は、一部のカテナン化合物に抗ガン作用があることを見いだした。

## 【0010】

すなわち、本発明による抗ガン剤は、化学式（I）

## 【化1】



で表されるカテナン化合物を有効成分として含有することを特徴とする。

## 【0011】

このカテナン化合物は、アミド型〔2〕カテナンと呼ばれる化合物の一種であり、正式には、3,11,18,26-Tetraazapentacyclo [26.2.2.213,16.15,9.120,24] hexatriaconta-5,7,9(36),13,15,20,22,24(33),28,30,34-dodecaene-4,10,19,25-tetrone(9Cl)と呼ばれる。上記化学式 (I) に示すように、このカテナン化合物は2つの分子環が鎖のように連結した構造を有しており、これら2つの分子環同士は共有結合によって結合していない。このため分子の形状が変化しやすく、受容体を介した取り込みが比較的困難となるが、これをガン細胞内に導入するとガン細胞の増殖が抑制されることが明らかとなった。

## 【0012】

このカテナン化合物をガン細胞内に導入するには、ガン細胞の細胞膜に孔を開け、この孔から細胞内に導入することが好ましい。細胞膜に孔を開ける方法としては、エレクトロポレーション法を用いることができる。エレクトロポレーション法を用いれば、局所的に上記カテナン化合物を導入することができることから、正常細胞に取り込まれる量を極めて少なくすることができ、その結果、副作用など患者の負担を軽減することが可能となる。

## 【0013】

現在のところ、本発明者により抗ガン作用が確認されたカテナン化合物は上記化学式 (I) に示すカテナン化合物だけである。しかしながら、細胞内に取り込まれにくく且つ一旦取り込まれれば容易に排出されないというカテナン化合物全般が有する特徴を考えれば、上記化学式 (I) に示すカテナン化合物以外にも、抗ガン作用を持つ他のカテナン化合物、さらには抗ガン作用を持つロタキサン化合物が存在するものと予測される。

## 【発明の効果】

## 【0014】

このように、本発明によれば、ガン細胞から排出されにくく且つ局所的治療に好適な抗ガン剤を提供することが可能となる。

## 【発明を実施するための最良の形態】

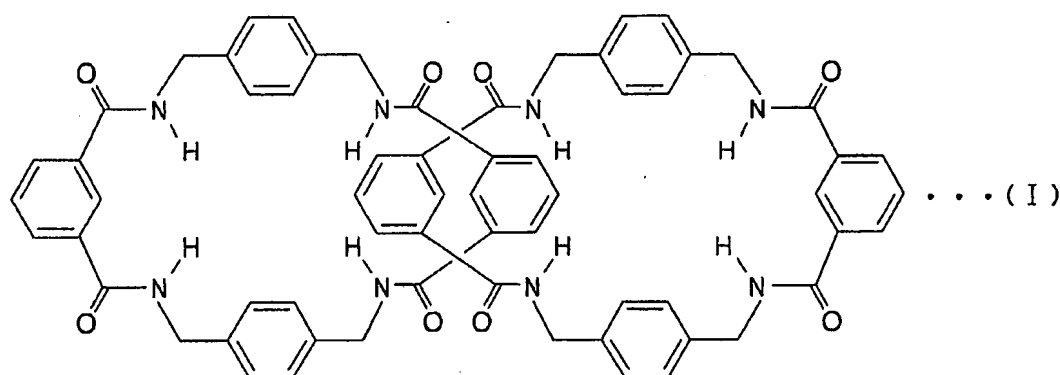
## 【0015】

以下、本発明の好ましい実施の形態について詳細に説明する。

## 【0016】

本発明による抗ガン剤は、上述のとおり、化学式 (I)

## 【化2】



で表されるカテナン化合物を有効成分として含有している。このカテナン化合物の合成方法については特に限定されないが、イソフタル酸ジクロリドとp-キシリレンジアミンを反応させることによって合成することが可能である。

## 【0017】

このようにして得られたカテナン化合物は、ジメチルスルホキサイド (DMSO) 等の溶剤に溶解することから、この溶液を抗ガン剤として用いることができる。溶液中のカテナン濃度としては、特に限定されるものではないが  $300 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上とすることが好ましい。これは、溶液中のカテナン濃度が  $300 \mu\text{g}/\text{mL}$  未満であってもガン細胞の増殖抑制効果は現れるものの、 $300 \mu\text{g}/\text{mL}$  以上である場合にその効果が顕著となるからである。

## 【0018】

このカテナン化合物を構成する2つの分子環は、共有結合によって結合していないことから形状が変化しやすく、受容体を介した取り込みが比較的困難である。このため、このカテナン化合物をガン細胞内に導入するためには、エレクトロポレーション法を用いてガン細胞の細胞膜に孔を開けることが好ましい。この場合の電圧波形はDCパルスとすることが好ましく、パルス電圧は100V程度、パルス周期は10msec程度とすることが好ましい。

## 【0019】

そして、エレクトロポレーション法等によりこのカテナン化合物をガン細胞内に取り込めば、ガン細胞はこれを容易に排出することができないため長時間に亘って作用するだけでなく、このカテナン化合物に対する耐性も非常に現れにくくなる。

## 【実施例】

## 【0020】

次に、本発明の実施例について説明する。

## 【0021】

## [細胞の採取]

## 【0022】

まず、マウスのcolon-26細胞(結腸ガン細胞)をカルチャーフラスコの内壁に接着させた。

## 【0023】

次に、ガン細胞の接着した面が下方となるようカルチャーフラスコを載置し、カルチャーフラスコ内に血清の含まれていない培地(RPMI, 8mL)を流して、ガン細胞を約1週間継体培養し、細胞の接着が十分ある状態(コンフルエント状態)とした。次に、カルチャーフラスコ内の培地を捨て、さらに、血清の含まれていない培地(RPMI, 5mL)でカルチャーフラスコ内を洗った。これにより、カルチャーフラスコの内壁に接着していない細胞はほぼ全て廃棄され、カルチャーフラスコ内には、内壁に接着し増殖した細胞のみが残った。

## 【0024】

次に、カルチャーフラスコ内にトリプシン入りのEDTA（エチレンジアミン四酢酸）液5mLを入れて内壁に接着している細胞を剥がした後、その全量をカルチャーチューブに移した。さらに、トリプシンを中和するために血清が含まれた培地（RPMI, 5mL）でカルチャーフラスコ内を洗い、その全量を先のカルチャーチューブ内に移した。

## 【0025】

次に、このカルチャーチューブ内を遠心分離（毎分1000回転、5分間）した後、上澄み液を捨て、血清が含まれた培地（RPMI, 10mL）で懸濁した。これにより、原試料となる懸濁液を得た。

## 【0026】

[エレクトロポレーション操作]

## 【0027】

上記懸濁液720 $\mu$ LとDMSO80 $\mu$ Lの合計800 $\mu$ Lからなるサンプル（サンプル1）を作成し、これを一對の電極を持つキュベット内に入れた。

## 【0028】

さらに、上記懸濁液720 $\mu$ Lと、式（I）に示したカテナンの濃度が60 $\mu$ g/mLであるDMSO溶液80 $\mu$ Lの合計800 $\mu$ Lからなるサンプル（サンプル2）を作成し、これを別のキュベットに入れた。

## 【0029】

さらに、上記懸濁液720 $\mu$ Lと、式（I）に示したカテナンの濃度が105 $\mu$ g/mLであるDMSO溶液80 $\mu$ Lの合計800 $\mu$ Lからなるサンプル（サンプル3）を作成し、これをさらに別のキュベットに入れた。

## 【0030】

さらに、上記懸濁液720 $\mu$ Lと、式（I）に示したカテナンの濃度が300 $\mu$ g/mLであるDMSO溶液80 $\mu$ Lの合計800 $\mu$ Lからなるサンプル（サンプル4）を作成し、これをさらに別のキュベットに入れた。

## 【0031】

そして、サンプル1～4が入っている各キュベットの電極にDCパルス（パルス電圧：104～108V、パルス周期：9～11msec）を印加し、エレクトロポレーション操作を行った。

## 【0032】

エレクトロポレーション操作が完了した後、血清が含まれた培地（RPMI, 5mL）が入っている15mLカルチャーチューブ内にサンプル1～4をそれぞれ移し、カルチャーチューブ内を遠心分離（毎分1000回転、5分間）した後、上澄み液を捨て、血清が含まれた培地（RPMI, 3mL）で懸濁した。

## 【0033】

[サンプルの評価]

## 【0034】

次に、血清が含まれない培地（RPMI, 500 $\mu$ L）で洗った後、血清が含まれた培地（RPMI, 500 $\mu$ L）を入れた24ウェルを4枚用意し、エレクトロポレーション操作を行ったサンプル1～4をいずれも40 $\mu$ Lずつ、対応する24ウェルに移して細胞を3日間培養した。

## 【0035】

培養後、各ウェル内の細胞をトリパンブルー染色法で染色し、顕微鏡下で細胞数を数えた。結果を図1に示す。図1に示すように、カテンン濃度の高いサンプルほど培養後の細胞数が少なく、これにより式（I）に示したカテンンにガン細胞の増殖抑制効果があることが確認された。特に、カテンン濃度が300 $\mu$ g/mLであるサンプル4では、カテナンを含まないサンプル1と比べて細胞数は約1/3に抑えられ、ガン細胞の増殖抑制効果が顕著であることが確認された。

## 【0036】

## 〔毒性の評価〕

【0037】

式(I)に示したカテナンを0.25%CMC(carboxy-methyl-cellulose)水溶液に懸濁し、約25gの雄マウス(2匹)に20mg/kgを経口投与した。その後、1週間観察したがいずれも生存し、その間、異常行動も認められなかった。また、食餌ならびに飲水は正常マウスと同様に同程度の量を摂取した。これにより、式(I)に示したカテナンの毒性が十分に低いことが確認された。

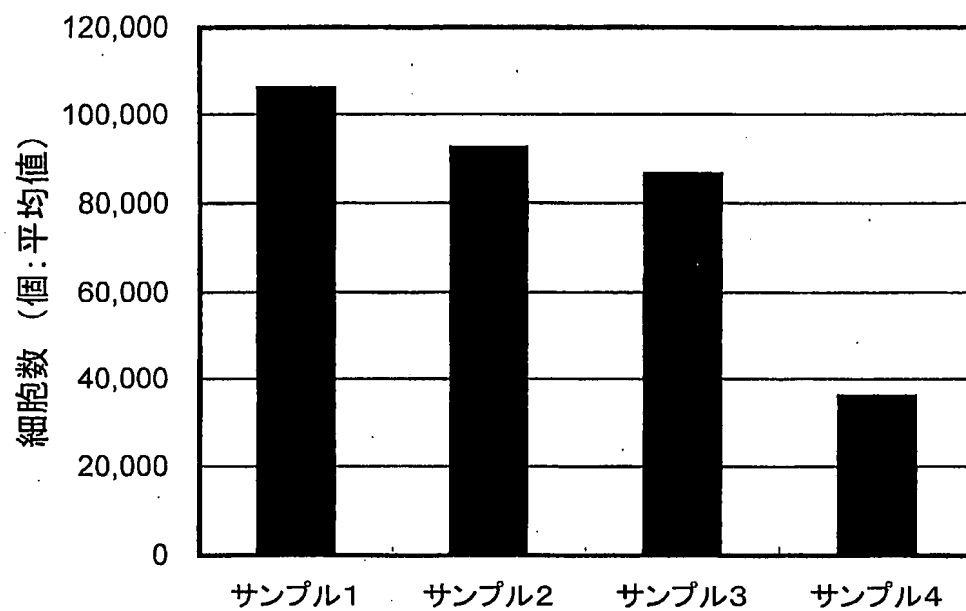
## 【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】 サンプル1～4の評価結果を示すグラフである。



【書類名】 図面  
【図 1】



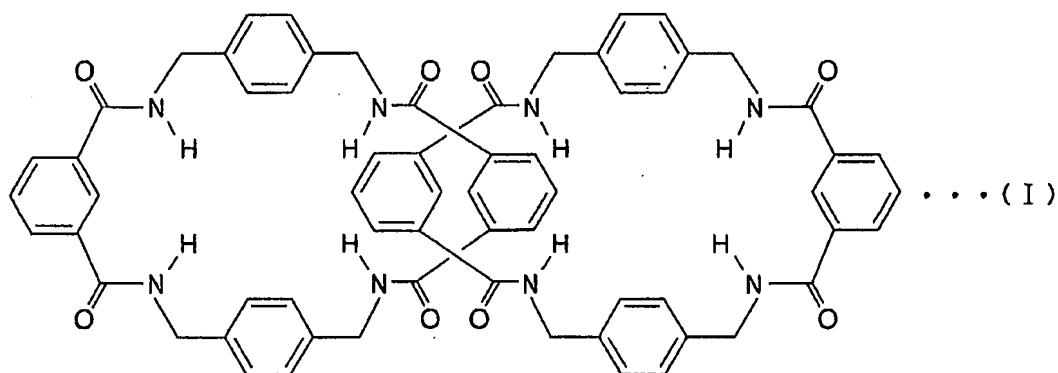
【書類名】要約書

【要約】

【課題】 ガン細胞から排出されにくく、且つ、ガン細胞に対する局所的治療に好適な新たな抗ガン剤を提供する。

【解決手段】 本発明による抗ガン剤は、化学式 (I)

【化1】



で表されるカテナン化合物を有効成分として含有する。このカテナン化合物は、アミド型  
[2] カテナンと呼ばれる化合物の一種であり、鎖のように連結した2つの分子環同士は共有結合によって結合していない。このため分子の形状が変化しやすく、受容体を介した取り込みが比較的困難となるが、これをガン細胞内に導入するとガン細胞の増殖が抑制される。

【選択図】

なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2004-063370
受付番号	50400373350
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成16年 3月11日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成16年 3月 8日

特願 2004-063370

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [504089688]

1. 変更年月日	2004年 3月 8日
[変更理由]	新規登録
住 所	福岡県福岡市城南区樋井川二丁目14番7号
氏 名	小野 信文